昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，February 2007，50(2)：191 – 196　　ISSN 0454-6296

造血器官机能障碍后家蚕血淋巴中蛋白质成分的变化

屠振力[1]，施美星[2]，小林泰彦[3]

(1. 浙江大学动物科学学院，杭州　310029；2. 浙江环龙环境保护公司，杭州　310012；
3. 日本原子能研究所，Takasaki 370-1292，Japan)

摘要：为了研究家蚕 *Bombyx mori* 造血器官机能障碍后其血淋巴中蛋白质成分的变化，利用重离子射线局部照射家蚕幼虫的造血器官，检测了照射后家蚕血淋巴中的蛋白质成分及注射大肠杆菌后在体内诱导出现的应急蛋白量的变化。结果表明，照射蚕血淋巴中的蛋白质含量与对照蚕之间没有明显的差异。但在成分分析时发现，5 龄起蚕血淋巴中 70 kD 附近的 3 条蛋白质谱带比对照蚕的浓度要高，随着个体的发育两者的浓度都上升；5 龄后期则相反，对照蚕的浓度比照射蚕高；脂肪体中贮藏蛋白质的含量具有相似的变化趋势。用家蚕贮藏蛋白质 SP-1 及 SP-2 的抗血清进行免疫印迹反应的结果显示：70 kD 附近的 3 条蛋白质谱带的最上面的一条为贮藏蛋白质 SP-1，下面的二条为贮藏蛋白质 SP-2；同时照射蚕血淋巴中分子量约为 24 kD 的蛋白质成分也发生变化，5 龄前期的浓度比对照蚕低，5 龄第 3 天几乎检测不到；全体照射与造血器官局部照射蚕之间的结果相似。照射蚕注射大肠杆菌后在体内诱导出现的应急蛋白量明显比对照蚕要少。由此认为家蚕幼虫造血器官与血淋巴中的蛋白质成分有关，造血器官的机能障碍、血球的数量减少可影响脂肪体中蛋白质的合成，从而使存在于血淋巴中的蛋白质成分发生变化。

关键词：家蚕；重离子射线；局部照射；造血器官；血淋巴；蛋白质

中图分类号：Q691；Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2007)02-0191-06

Change in hemolymph proteins of silkworm after hemopoietic organs being damaged

TU Zhen-Li[1]，SHI Mei-Xing[2]，KOBAYASHI Yasuhiko[3] (1. College of Animal Sciences，Zhejiang University，Hangzhou 310029，China；2. Zhejiang Huanlong Environmental Protection Co.，Hangzhou 310012，China；3. Japan Atomic Energy Research Institute，Takasaki 370-1292，Japan)

Abstract：To study the change of proteins in hemolymph after hemopoietic organs of silkworm (*Bombyx mori*) being damaged，heavy ion beams ($^{12}C^{5+}$，18.3 MeV/μ，range = 1.1 mm，100 Gy) were used to locally irradiate the hemopoietic organs-wing disc complex at the premolting stage of the 4th instar. The total hemolymph proteins and bacterial challenge-related proteins induced by *E. coli* were investigated during the 5th instar. The results indicated that there was no significant difference in hemolymph proteins between irradiated individuals and the controls. Only the concentration of 70 kD proteins in irradiated silkworms were observed higher at day 0 of the 5th instar and lower at the later stage of the 5th instar than those of the respective controls. The content of storage protein in fat body showed the similar change tendency with that in hemolymph. The storage proteins were analyzed by Western blotting，and the results showed the 1st protein band near 70 kD was storage protein SP-1，the below two were storage proteins SP-2. Additionally 24 kD proteins in irradiated individuals also changed：it was lower than that of the controls at early days，hardly detected at the 3rd day of 5th instar. Similar effects were also observed in the larvae generally irradiated with heavy ion beams. For irradiated individuals the quantity of bacterial challenge-related proteins in hemolymph induced by *E. coli* significantly decreased. It was so concluded that silkworm hemopoietic organs were related to the formation of hemolymph proteins，and due to the decrease of hemocytes caused by functional disruption

---

基金项目：教育部留学回国人员科研启动基金(J20040269)；浙江省教育厅基金项目(G20040392)；浙江省自然科学基金项目(Y305224)；国家重大基础研究发展计划‘973’项目(2005CB121003)

作者简介：屠振力，男，1966 年 5 月生，博士，副教授，从事分子生物学、放射生物学及昆虫机能利用学研究，E-mail：tuzl@zju.edu.cn

收稿日期 Received：2006-06-26；接受日期 Accepted：2006-07-31

of hemopoietic organs, synthesis of protein in fat body was affected and protein components in hemolymph changed.

Key words: *Bombyx mori*; heavy ion beam; local irradiation; hemopoietic organ; hemolymph; protein

鳞翅目昆虫的血球在造血器官内生成,然后释放到血液中并以浮游状态存在于血液中。有关家蚕 *Bombyx mori* 幼虫造血器官的生理功能研究,Nittono 等(1964)利用外科手术摘除造血器官来解析其对机体的影响,但这种外科手术对虫体损伤很大、死亡率高或发育延缓,而且出血的影响不能被忽视;Gamo 等(1959)曾注射放射线同位素,通过内照射的方法来进行造血器官的机能解析,但这种方法得到目的器官机能不全的个体的概率很低,而且虽然得到了这样的个体,因全身的所有组织器官都被放射线感染,解析某一特定器官的机能是很困难的。

重离子射线是一种高能宇宙射线,具有很强的能量传递性(linear energy transfer, LET),同时具有很高的相对生物效能(relative biological effectiveness),其生物体内照射的深度及范围能够控制(Kraft, 1987; Blakely, 1992)。作者等利用重离子射线的照射深度和照射范围能够控制这一特点,已成功地开发出使昆虫体内某一特定组织或器官失活的放射线显微手术技术(屠振力等,2004a);而家蚕幼虫的造血器官附着在第 2、3 体节的翅原基的表面(Nittono *et al*., 1964; Sato and Akai, 1977),对胸部左右侧的该部位进行重离子射线的局部照射,丧失造血器官的机能是完全可能的(屠振力等,2004b)。本研究利用重离子射线局部照射这一放射线显微手术技术,对家蚕幼虫的造血器官进行失活照射,调查了照射后家蚕血淋巴中的蛋白质含量及其成分的变化。

1 材料与方法

1.1 试虫

家蚕着色非滞育系统(*pnd*),全龄,25℃、RH 70%~80%、光周期 16L∶8D 的条件下,用人工饲料饲育。取 4 龄第 3 天的幼虫(雌)用于实验。

1.2 重离子射线局部照射造血器官的方法

重离子射线照射利用日本原子能研究所高崎研究所的重离子照射研究设施中的深度控制种子照射装置,供试重离子射线为碳离子($^{12}C^{5+}$, 18.3 MeV/μ),照射剂量为 100 Gy。

造血器官的局部照射方法:先在 2 mm 厚的丙烯酸树脂板上制作直径为 4 mm 的孔,将位于家蚕幼虫第 2、3 体节的造血器官部位对准该孔,并用透明胶带纸将幼虫部分固定在照射用材料台上,通过此孔对造血器官进行照射(屠振力等,2004a)。树脂板的厚度为 2.0 mm,碳离子射线的水中射程约为 1.1 mm,因此,碳离子射线不能穿过该丙烯酸树脂板。照射一般先是进行左侧造血器官的照射,然后进行右侧造血器官的照射。

1.3 蛋白质的收集和分析

5 龄起蚕后每天采血,加少量苯基硫脲,静置 5~10 min,3 000 r/min 离心 10 min,收集血清;蛋白质的定量分析采用 Bradford(1976)的方法进行。脂肪体中蛋白质的收集:分别解剖收集照射蚕和对照蚕的脂肪体,蒸馏水洗净,用绵纸吸去多余的水分后称重,加入鲜重 10 倍量的生理盐水后进行磨碎,磨碎液在 10 000 r/min 条件下离心 10 min,得到上清液;蛋白质的 SDS-PAGE 分析采用 Laemmli(1970)的方法。每次取样个体数为 5~7 个。

1.4 蛋白质的免疫印迹反应

血淋巴及脂肪体中的蛋白质经 SDS-PAGE 后,转到 PVDF 膜上,然后用家蚕贮藏蛋白质 SP-1 和 SP-2(Nagata and Kobayashi, 1990)的抗血清进行免疫印迹反应,以检测血淋巴及脂肪体中的贮藏蛋白质 SP-1 和 SP-2。

1.5 注射大肠杆菌后家蚕血淋巴中诱导的应急蛋白质的鉴定

将大肠杆菌 JM109 菌体悬浮液 5 μL(10 000 个/μL)注射到对照蚕及照射蚕的 5 龄第 1 天幼虫,注射后 6 h 及 24 h 分别采血,以 3 000 r/min、4℃离心 10 min 后收集血清。每一样本取 1 μL 用于 SDS-PAGE 分析,血淋巴中诱导的应急蛋白质的鉴定采用 Laemmli(1970)的方法。

2 结果与分析

2.1 血淋巴中蛋白质含量的变化

分别对照射蚕和对照蚕血淋巴中的蛋白质含量进行定量分析,由图 1 可见,对照蚕、全体照射及造血器官局部照射蚕均随着发育血淋巴中的蛋白质

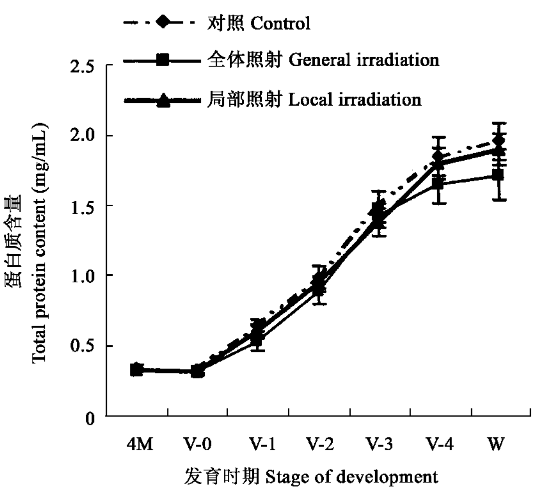

图 1　碳离子射线照射后家蚕血淋巴中蛋白质含量的变化

Fig.1　Change of total protein content in hemolymph of the 5th instar silkworm after irradiation with carbon ions

4M：4 **眠蚕** The 4th molting silkworm；V-x：5 **龄第** x **天** Day x of the 5th instar；W：**熟蚕** Wandering stage.

的含量上升，三者之间的变化趋势相似；到熟蚕期，对照蚕的蛋白质含量最高，局部照射蚕其次，全体照射蚕含量最低，但三者之间的差异不显著。

2.2　血淋巴中蛋白质成分的变化

用 SDS-PAGE 法分析了照射蚕和对照蚕血淋巴中蛋白质的成分变化，从 5 龄起蚕的血淋巴成分来看，电泳谱带大致与对照相同，但也发现几种含量不同的蛋白质成分：其中之一是分子量约 70 kD 附近的 3 条谱带，5 龄起蚕时照射蚕的浓度比对照蚕要高；70 kD 附近的三条谱带，对照蚕也是随着个体发育浓度上升，到 5 龄第 3 天时与对照蚕的浓度差异不明显（图 2，实线箭头）；另一个照射后受影响的蛋白质是分子量大致为 24 k D，重离子射线照射蚕的 5 龄起蚕及第 2 天的浓度明显比对照蚕要低，5 龄第 3 天几乎检测不到（图 2，虚线箭头）；全体照射与局部照射蚕之间的血淋巴成分没有明显的差异。

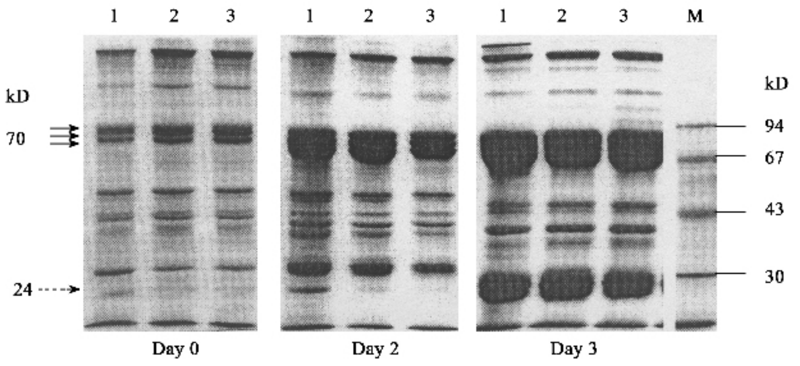

图 2　碳离子射线照射后 5 龄家蚕血淋巴中蛋白质成分的变化

Fig. 2　Change of protein components in hemolymph of the 5th instar silkworms after irradiation with carbon ions

1：**对照** Control；2：**局部照射** Local irradiation；3：**全体照射** General irradiation；M：**蛋白质分子量标准** Protein molecular weight marker. **实线箭头表示贮藏蛋白质** Arrow heads show the positions of storage proteins (SP-1 and SP-2)；**虚线箭头表示** 24 kD **蛋白质** Dashed arrow heads indicates the position of 24 kD protein.

2.3　免疫印迹法检测血淋巴中的贮藏蛋白质

为了确认血淋巴中 70 kD 附近的 3 条蛋白质谱带是否为贮藏蛋白质，用家蚕贮藏蛋白质 SP-1 及 SP-2 的抗血清分别对 5 龄起蚕的血淋巴进行了免疫印迹反应，同时为了调查照射蚕血淋巴中蛋白质的浓度变化，局部照射蚕的 5 龄起蚕的血淋巴与同时期的对照蚕血淋巴在同样条件下进行电泳（全体照射与造血器官局部照射结果相似，所以省略），结果显示，抗 SP-1 的抗血清与 70 kD 附近的三条蛋白质谱带中的最上面的一条谱带反应，抗 SP-2 的抗血清与 70 kD 附近的三条蛋白质谱带中的下面的二条谱带反应（图 3）；另外与图 2 显示的结果同样，与对照蚕相比，照射蚕 5 龄起蚕的血淋巴中的蛋白质明显与两抗体进行反应。

2.4　照射后家蚕脂肪体中贮藏蛋白质的含量变化

照射后家蚕脂肪体中贮藏蛋白质含量的变化如图 4 所示，在未照射 5 龄起蚕中能检测到少量贮藏蛋白质，而照射蚕中贮藏蛋白质的浓度明显比对照蚕的高；相反，到 5 龄第 3 天时照射蚕脂肪体中贮藏蛋白质的含量明显比对照蚕要低，且差异达极显著水平（$P < 0.01$）。

2.5　注射大肠杆菌后家蚕血淋巴中应急蛋白质的

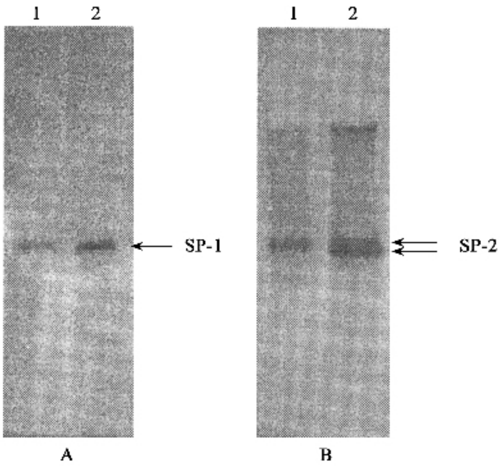

图 3 碳离子射线照射后家蚕血淋巴中贮藏蛋白质(SP-1 和 SP-2)的免疫印迹反应

Fig. 3 Western blotting analyses of storage proteins (SP-1 and SP-2) in hemolymph of the silkworm after irradiation with carbon ions

A：用 SP-1 抗血清检测 SP-1 Detection of SP-1 by using antiserum against SP-1；B：用 SP-2 抗血清检测 SP-2 Detection of SP-2 by using antiserum against SP-2. 1：对照 Control；2：局部照射 Local irradiation.

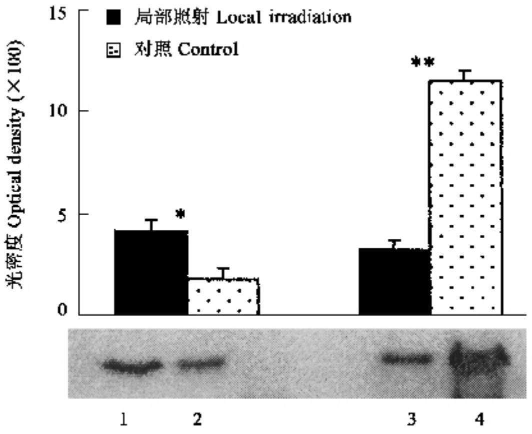

图 4 碳离子射线照射后家蚕脂肪体中贮藏蛋白质(SP-1)的含量变化

Fig. 4 Change of storage proteins (SP-1) content in the fat body of the silkworm after irradiation with carbon ions

1：5 龄起蚕(局部照射) Newly exuriated 4th instar (local irradiation)；2：5 龄起蚕(对照) Newly exuriated 4th instar (Control)；3：5 龄第 3 天(局部照射) Day 3 of the 5th instar (local irradiation)；4：5 龄第 3 天(对照) Day 3 of the 5th instar (Control). ＊：$P < 0.05$，＊＊：$P < 0.01$ (*T*-测验 *t*-test).

诱导量

大肠杆菌注射后在血淋巴中诱导出现的蛋白质量如图 5：未照射蚕在注射 6 h 后即在血淋巴中出现诱导应急蛋白质(箭头所示)，而此时照射蚕还未能观察到诱导的蛋白质；注射 24 h 后，虽照射蚕也开始出现诱导蛋白质，但明显比对照蚕诱导的量要少(箭头所示)。

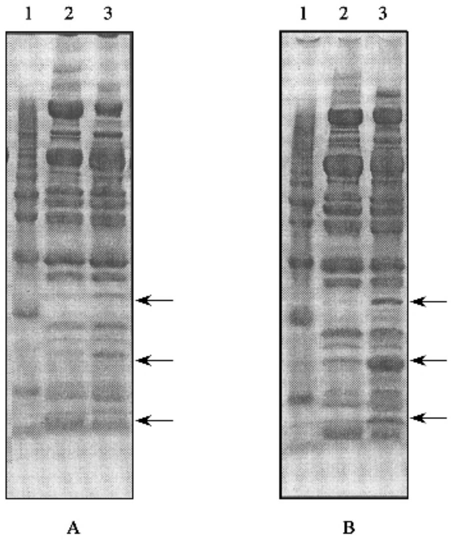

图 5 注射大肠杆菌后家蚕血淋巴中应激蛋白的诱导量

Fig. 5 Bacterial challenge-related protein induced in hemolymph after local irradiation, analyzed with SDS-PAGE

A：注射后 6 h (6 h after injection)；B：注射后 24 h (24 h after injection). 1：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；2：局部照射 Local irradiation；3：对照 Control. 箭头表示微生物诱导的应急蛋白质 Arrow indicates the position of bacterial challenge-related protein induced by injection *E. coli*.

3 讨论

用 100 Gy 的碳离子射线照射能完全破坏家蚕幼虫的造血器官，使其丧失造血器官的机能，引起血球的数量下降和机能降低(屠振力等，2004b，2004c)。100 Gy 碳离子射线照射家蚕的造血器官后，5 龄期血淋巴中的蛋白质含量和成分与对照蚕没有明显的差异；但也发现了几种浓度发生变化的成分(图 1，2)，其中之一是 70 kD 附近的三条蛋白质谱带，照射后的 5 龄起蚕的浓度比对照蚕要高；用 SP-1 及 SP-2 的抗血清进行免疫印迹反应显示其中条带 1 为贮藏蛋白质 SP-1，条带 2 和条带 3 为贮藏蛋白质 SP-2。同时照射蚕与对照蚕相比，5 龄起蚕血淋巴中的蛋白质明显与两抗体发生反应，所以照射蚕血淋巴中的贮藏蛋白质的含量增加得到确认(图 2，3)，有意义的是造血器官局部照射蚕也与全体照射蚕一样在照射初期具有促进贮藏蛋白质合成

的现象。对照蚕与照射蚕都是随着个体的发育贮藏蛋白质的含量增加，用 SDS-PAGE 分析时 5 龄第 3 天观察不到差异，而用 SP-1 及 SP-2 的抗血清进行免疫印迹反应显示照射后在脂肪体中贮藏蛋白质的含量减少（图 4）。家蚕的贮藏蛋白质在脂肪体中合成（Toji *et al*.，1980；Nagata and Kobayashi，1990），有关造血器官的机能障碍对脂肪体中贮藏蛋白质合成的影响机理现在还不清楚，推测可能是造血器官受照射后，血球（或血球由来的某种物质）释放某种刺激信息传递到脂肪体，从而促使脂肪体合成贮藏蛋白质，随后由于造血器官的机能降低及血球的数量减少，释放的信息量减小，使得对脂肪体的刺激作用减少，导致在脂肪体中的贮藏蛋白质的合成数量下降（图 4），但对于其调控机理需要进一步研究。另一个因为照射而浓度低的血淋巴蛋白质成分的分子量约为 24 kD，照射蚕的 5 龄起蚕及第 2 天明显比对照蚕要低，5 龄第 3 天几乎检测不到（图 2，虚线箭头）。Izumi 等（1984）也报道过这个成分，但其化学性状、合成分泌部位及其生理机能等都不明了。个体间的生理差异经常反映在血淋巴成分的差异上（Doira，1968；Banno *et al*.，1993），造血器官的功能受到破坏而使血球的形成受阻，也可能引起血淋巴中某些成分发生变化。作者等正在进行该蛋白质的合成部位及其功能的研究（另文发表）。

昆虫在感染病菌或体壁受到损伤的情况下能够迅速诱导在血液中产生一系列低分子量的抗菌蛋白或多肽，杀死病菌并且阻止病菌的继续侵染（Okada and Natori，1983；Ando and Natori，1988；Morishima *et al*.，1988；Fehlbaum *et al*.，1994），昆虫的抗菌蛋白质是在血球或脂肪体中合成的（Ando and Natori，1988；Fehlbaum *et al*.，1994；Xu *et al*.，1995）。照射蚕注射大肠杆菌后诱导的应急蛋白量下降（图 5），可能是由于造血器官的机能障碍，使功能血球的数量减少，所以在注射大肠杆菌后，使得血球认识外来异物的能力及传递给脂肪体的信号减弱，导致在脂肪体中诱导合成的应急蛋白的数量减少，但诱导的蛋白质是否为抗菌蛋白还需要进一步鉴定。

本研究结果表明，家蚕的造血器官与血淋巴中的蛋白质成分有关，造血器官的机能障碍后引起血球的数量减少及机能低下，减弱了传递给脂肪体的刺激信息，使脂肪体中蛋白质的合成减少，从而使存在于血淋巴中的蛋白质成分发生了变化。

致谢 本研究的部分工作在日本原子能研究所高崎研究所内进行。感谢日本东京大学大学院新领域创成科学研究科永田昌男教授提供贵重的贮藏蛋白质（SP-1 和 SP-2）的抗血清。

参 考 文 献（References）

Ando K，Natori S，1988. Inhibitory effect of sarcotoxin Ⅱ A，an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*，on growth of *Escherichia coli*. *J*. *Biochem*.，103：735－739.

Banno Y，Tochihar S，Kawaguchi Y，Doir H，1993. Hemolymph proteins during larval development of *Bombyx mori*："proteins of young larvae". *J*. *Seri*. *Sci*. *Jpn*.，62：187－194（in Japanese）.

Blakely EA，1992. Cell inactivation by heavy charged particles. *Radiat*. *Environ*. *Biophys*.，31：181－196.

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal*. *Biochem*.，72：248－254.

Doira H，1968. Developmental and sexual differences of hemolymph proteins in the silkworm，*Bombyx mori*. *Bull*. *Sci*. *Fac*. *Agr*. *Kyushu Univ*.，23：205－214（in Japanese）.

Fehlbaum P，Bulet P，Michaut L，Lagueux M，Broekaert WF，Hetru C，Hoffmann JA，1994. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J*. *Biol*. *Chem*.，269：33 159－33 163.

Gamo T，Nishiyama H，Konayashi A，1959. Studies on the influence of radio-active rays upon the physiological functions of the silkworm，*Bombyx mori* L.（Ⅲ）：On the effects of concentration of ingested radio-isotopes on the number of hemocytes of the silkworm. *Bull*. *Sci*. *Fac*. *Textile*. *Shinshu Univ*.，9：83－91（in Japanese）.

Izumi S，Kiguchi K，Tomino S，1984. Hormonal regulation of biosynthesis of major plasma proteins in *Bombyx mori*. *Zool*. *Sci*.，1：223－228.

Kraft G，1987. Radiobiological effects of very heavy ions：inactivation，induction of chromosome aberrations and strand breaks. *Nucl*. *Sci*. *Appl*.，3：1－28.

Laemmli UK，1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*，227：680－685.

Morishima I，Suginaka S，Bougaki T，Inoue M，Ueno T，1988. Induction and partial characterization of antibacterial proteins in the hemolymph of the silkworm，*Bombyx mori*. *Agric*. *Bio*. *Chem*.，52：929－934.

Nagata M，Kobayashi M，1990. Quantitative changes in storage proteins during larval development of the silkworm，*Bombyx mori*. *J*. *Seric*. *Sci*. *Jpn*.，59：461－468.

Nittono Y，Tomabechi S，Onodera N，1964. Formation of hemocytes near imaginal wing discs in the silkworm，*Bombyx mori* L.（preliminary note）. *J*. *Seri*. *Sci*. *Jpn*.，33：43－45（in Japanese）.

Okada M，Natori S，1983. Purification and characterization of an antibacterial protein from hemolymph of *Sarcophagi peregrine*（flesh fly）larvae. *J*. *Biochem*.，211：727－734.

Sato S，Akai H，1977. Development of hemopoietic organs of the silkworm，

Bombyx mori L. *J*. *Seri*. *Sci*. *Jpn*., 46: 397 – 403 (in Japanese).

Tojo S, Nagata M, Kobayashi M, 1980. Storage proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem*., 10: 289 – 303.

Tu ZL, Kobayashi Y, Kiguchi K, 2004a. Application of heavy ion beams radio-surgery to function analysis of insect specific organ. *Acta Entomol*. *Sin*., 47(6): 844 – 848. [屠振力,小林泰彦,木口憲爾,2004a. 重离子射线局部照射技术在昆虫机能解析中的应用. 昆虫学报,47(6): 844 – 848]

Tu ZL, Huang YF, Kobayashi Y, 2004b. Sensitivity of heavy ion beams in the hemopoietic organ of the silkworm *Bombyx mori*. *J*. *Agri*. *Biotech*., 12(5): 564 – 567. [屠振力,黄衍峰,小林泰彦,2004b. 家蚕幼虫的造血器官对重离子射线 $^{12}C^{5+}$ 的感受性. 农业生物技术学报,12(5): 564 – 567]

Tu ZL, Ye ZY, Shi MX, Kobayashi Y, Lu SL, 2004c. Hemocyte function and antibacterial activity of hemolymph after destroying hemopoietic organ of silkworm *Bombyx mori* with heavy ion beam radio-surgery. *Acta Seri*. *Sin*., 30(3): 266 – 268. [屠振力,叶志毅,施美星,小林泰彦,吕顺霖,2004c. 造血器官受损对家蚕血球机能与抗菌活性影响. 蚕业科学, 30(3): 266 – 268]

Xu J, Nishijima M, Kono Y, Taniai K, Kato Y, Kadono-Okuda K, Yamamoto M, Shimabukuro M, Chowdhury S, Su KC, Yamakawa M, 1995. Identification of a hemocyte membrane protein of the silkworm, *Bombyx mori*, which specifically binds to bacterial lipopolysaccharide. *Insect Biochem*. *Mol*. *Biol*., 25(8): 921 – 928.

(责任编辑:黄玲巧)